Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. med. Walther Graumann

CYTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS ANTIRHEUMATISCHER ARZNEISTOFFE AUF DIE AKTIVITÄT NEUTRALER PROTEASEN IN NEUTROPHILEN GRANULOCYTEN

INAUGURAL–DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät

(Theoretische Medizin)

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

GABRIELE KATHARINA LÖFFLER

aus Tübingen

1983

UNIV.
LONDON
SOC.

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. med. Walther Graumann

CYTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS ANTIRHEUMATISCHER ARZNEISTOFFE AUF DIE AKTIVITÄT NEUTRALER PROTEASEN IN NEUTROPHILEN GRANULOCYTEN

INAUGURAL–DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät

(Theoretische Medizin)

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

GABRIELE KATHARINA LÖFFLER

aus Tübingen

1983

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Horst Ritter

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Christian Kleßen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Jörg Ruoff

INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung	Seite 1
Material und Methoden	Seite 3
Befunde und Tabellen	Seite 7ff
Diskussion	Seite 8
Literatur	Seite 18

Abbildungen und Abbildungslegenden am Ende der Arbeit

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543922_0050

EINLEITUNG

Neutrophile Granulocyten besitzen durch ihre Fähigkeit zur Phagocytose von Mikroorganismen und anderen antigenen Substanzen eine Schlüsselrolle im Rahmen der unspezifischen Körperabwehr. Ihre Aufenthaltsdauer im peripheren Blut ist - nach Ausschwemmung aus dem Knochenmark - nur kurz (ca. 24 Std.). Sie verlassen anschließend die Blutbahn und wandern in die benachbarten Gewebe aus, wo sie den Organismus vor eindringenden Krankheitserregern schützen. Hauptorte der Neutrophilen - Emigration sind die Schleimhäute des Magen-Darm-Kanals, des Respirationstraktes, des äußeren Genitales und der Konjunktiven sowie die Haut und das lymphatische Gewebe (TEIR 1974; LENNERT 1977). Im Gewebe überleben die Neutrophilen durchschnittlich 3 Tage und gehen anschließend zugrunde. Die Bedeutung der Neutrophilen für die Körperabwehr läßt sich eindrucksvoll an einem Krankheitsbild ablesen, welches durch ein mehr oder minder vollständiges Fehlen der Neutrophilen gekennzeichnet ist, der sog. Granulocytopenie resp. Agranulocytose: Infolge Fehlens der Neutrophilen sowohl im peripheren Blut wie auch in den Geweben können pathogene Krankheitserreger ungehindert in die Schleimhäute eindringen, wodurch es im Magen-Darm-Kanal, insbesondere im Tonsillen-Rachen-Bereich und im Respirationstrakt zu granulocytopenischen Schleimhautnekrosen mit Geschwürsbildung kommt (GRUNDMANN 1975).

Normalerweise reagiert der Organismus beim Eindringen von pathogenen Mikroorganismen mit lokal-entzündlichen Erscheinungen, in deren Verlauf neutrophile Granulocyten in großer Zahl, durch chemotaktisch wirksame Stoffe angelockt, die Blutbahn verlassen und den Ort des entzündlichen Geschehens infiltrieren. Hier werden die eingedrungenen Erreger phagocytiert, abgetötet und verdaut. Beim Abbau des phagocytierten Materials sind verschiedene lysosomale Granulocyten-Proteasen beteiligt, von denen ein Teil sein pH-Optimum im neutralen bis leicht alkalischen pH-Bereich besitzt; diese werden entsprechend als neutrale Proteasen bezeichnet. Durch vermehrte Freisetzung derartiger neutraler Proteasen bei gleichzeitiger relativer Minderung oder Inaktivierung zirkulierender und gewebeständiger Proteaseinhibitoren (z.B. α_1-Antitrypsin, α_2-Makroglobulin) kann es durch die eiweißabbauende Enzymaktivität zu mehr oder minder ausgedehnten Gewebsschädigungen im Entzündungsbereich kommen (JANOFF et

UNIV. LEIDEN

al. 1975). Die neutralen Granulocyten-Proteasen können dadurch paradoxerweise selbst "krankmachende" Bedeutung gewinnen. So besteht Übereinstimmung darüber, daß neutrale Granulocyten-Proteasen bei entzündlichen Gelenkprozessen, insbesondere bei der rheumatoiden Arthritis, durch Abbau der Knorpelmatrix an der Gelenkdestruktion beteiligt sind (LAZARUS et al. 1968; LAZARUS et al. 1976; BARRET 1978; ORONSKY und BUERMANN 1978; MOHR et al. 1979; MENNINGER et al. 1980).

Auch bei der Entwicklung mancher Formen des Lungenemphysems (LAURELL und ERIKSON 1963; HARRIS et al. 1975; RODRIGUEZ et al. 1977) sowie der bei Polytraumatisierung sich häufig entwickelnden Schocklunge spielen neutrale Granulocyten-Proteasen eine für die Pathogenese wichtige Rolle (JANOFF 1970; MURRAY 1977; CRADDOCK et al. 1977; LEE et al. 1981). Für die Therapie dürfte in diesem Zusammenhang die Anti-Proteasewirkung effizienter Arzneistoffe von Bedeutung sein.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, mittels eines einfachen Testsystems an Blutausstrichen zu prüfen, inwieweit antirheumatisch/antiphlogistisch wirksame Arzneistoffe die Aktivität neutraler Granulocyten-Proteasen zu beeinflussen vermögen. Hierzu wurde eine Technik verwendet, die den cytochemischen Nachweis neutraler Proteasen aus neutrophilen Granulocyten an Blutausstrichen gestattet (KLESSEN 1978, 1980). Die enzymatische Aktivität der aus neutrophilen Granulocyten freigesetzten Proteasen dokumentiert sich bei Verwendung dieser Technik in einem ringförmigen Abbau von Erythrocyten und Plasma um die jeweils zentral gelegenen Neutrophilen.

MATERIAL UND METHODEN

Die Untersuchungen wurden an Blutausstrichen von gesunden adulten Probanden beiderlei Geschlechts durchgeführt. Das Blut wurde durch Venenpunktion entnommen und in EDTA-Röhrchen aufgefangen. Unmittelbar anschließend wurden gleichmäßig dünne Blutausstriche angefertigt, die für 18 - 24 h luftgetrocknet wurden.

Der Nachweis leukocytärer Proteasen aus neutrophilen Granulocyten erfolgte mit der von KLESSEN (1978) angegebenen Technik. Hierbei wurden die Blutausstriche in folgender Weise behandelt:

1. 5 min Formol Sublimat (100 ml 5% Sublimat, 5 ml 37% Formalin)
2. 2 min fließend wässern, spülen in aqua demin.
3. Inkubation der Ausstriche in 0.25 M NaCl in Boratpuffer pH 8.5 bei 37° C. Inkubationszeit 180 min. Lösung vorwärmen.
4. 5 sec spülen in aqua demin.
5. 10 min 0.05 N HCl
6. 30 min kolloidale Eisenlösung (s.u.)
7. 10 sec spülen in 0.05 N HCl; anschließend 5 min in einer zweiten Küvette.
8. 10 min Kaliumferrocyanidlösung (s.u.)
9. 2 min fließend wässern
10. Entwässern über aufsteigende Alkoholreihe und Eindecken in Eukitt.

Als Inkubationsmedium wurde Sørensens Boratpuffer pH 8.5 verwendet (LILLIE und FULLMER 1976). Der Puffer wurde aus 350 ml 0.1 N HCl und 650 ml Borat hergestellt. Die Boratlösung besteht aus 12.404 g Borsäure, gelöst in 100 ml 1 N NaOH. Sie wird mit aqua demin auf 1000 ml aufgefüllt. Dem Puffer wird NaCl bis zu einer Endkonzentration von 0.25 M zugesetzt.

Die kolloidale Eisenlösung wurde nach dem Verfahren von MÜLLER (1955) hergestellt: 12 ml einer 32%igen Eisen(III)-chloridlösung ($FeCl_3 \times 6H_2O$; Merck, Darmstadt) werden langsam in 750 ml kochendes aqua demin. eingeleitet. Die Lösung ist nach dem Abkühlen sofort gebrauchsfertig, läßt sich wiederholt verwenden und ist monatelang haltbar. Die Kaliumferrocyanidlösung wird unmittelbar vor Gebrauch angesetzt: 30 ml 2% Kaliumferrocyanidlösung ($K_4Fe(CN)_6 \times 3H_2O$; Merck), 60 ml 1% HCl.

Folgende Pharmaka wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf neutrale Leukocyten-Proteasen getestet: Glykosaminoglykanpolysulfat (Arteparon (R)), Luitpold, München; Pentosanpolysulfat (SP 54 (R)), Benechemie, München; Aurothiopolypeptid (Auro-Detoxin (R)), Wülfing, Neuss; D-Penicillamin (Metalcaptase (R)), Heyl, Berlin und Knoll, Ludwigshafen; Phenylbutazon (Butazolidin (R)), Oxyphenbutazon (Tanderil (R)), Ciba-Geigy, Wehr-Baden; Acetylsalicylsäure (Aspirin (R)), Chloroquin (Resochin(R)), Bayer, Leverkusen; Indometacin (Amuno (R)), Sharp und Dohme, München; Piroxicam (Felden (R)), Pfizer, Brüssel, Belgien; Azathioprin (Imurek (R)), Wellcome, Großburgwedel; Prednisolon (Solu-Decortin (R)), Merck, Darmstadt; Methotrexat (Methotrexat "Lederle"(R)), Cyanamid, München; Cyclophosphamid (Endoxan (R)), Asta, Bielefeld.

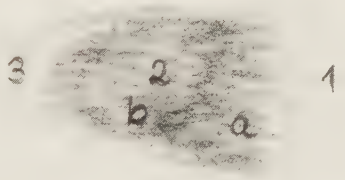
Die Testsubstanzen wurden jeweils als Trockensubstanz in Puffer gelöst, Glykosaminoglykanpolysulfat als Injektionslösung zugesetzt. Jede Substanz wurde an Blutausstrichen von mindestens drei Spendern und in einer Konzentrationsreihe über vier Konzentrationen getestet: 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 mg/ml.

Die Inkubation erfolgte in Küvetten mit 100 ml Inkubationsmedium, die Raum für maximal 8 Objektträger bieten. Die Inkubationsdauer betrug generell 180 min und erfolgte bei 37°C im Brutschrank. Die Pufferlösung wurde vor Versuchsbeginn auf 37°C erwärmt. Die Kontrollausstriche wurden in NaCl-Boratpuffer ohne Zusatz eines Arzneistoffes unter sonst identischen Bedingungen (Zeit, Temperatur) inkubiert. Ferner wurden Ausstriche ohne NaCl- und ohne Wirkstoffsubstanz in Boratpuffer inkubiert. Sofern Hinweise auf eine "Aktivierung" neutraler Neutrophilen-Proteasen bestanden (Methotrexat, Indometacin, Azathioprin), wurden kürzere Inkubationszeiten (120, 60 und 30 min) gewählt, bei denen an den Kontrollausstrichen

die Hofbildung deutlich geringer ausgeprägt ist als nach 180 min Inkubationsdauer und dementsprechend eine möglicherweise wirkstoffbedingte verstärkte Hofbildung deutlicher erkennbar wird.

Kriterien der Auswertung: Die Auswertung der Ausstriche erfolgte durch Beurteilung der Hofgröße um die neutrophilen Granulocyten in willkürlichen Einheiten von 0 - 3. Dabei entspricht 3 einer deutlich ausgeprägten Hofbildung, wobei die kreisförmigen Höfe klar vom umgebenden Ausstrich abgetrennt und frei von Erythrocyten und Plasma sind. Der Mindestdurchmesser der Höfe in den bei jedem Versuch mitgeführten Kontrollausstrichen sollte 40µm nicht unterschreiten. Sind in den Kontrollausstrichen die Höfe kleiner (40µm) oder nur unvollständig ausgebildet, wurde der Versuch verworfen.

Bei der vergleichenden Beurteilung verschiedener Ausstriche muß man berücksichtigen, daß ein Blutausstrich weder an allen Stellen gleich dick ist noch eine einheitliche Verteilung der Blutzellen zeigt. Die Höfe erscheinen entsprechend kleiner, je dicker der Ausstrich ist und umso größer, je dünner er ist und je mehr Neutrophile an einer Stelle versammelt sind. Aus diesem Grund dürfen nur die Abschnitte der Ausstriche miteinander verglichen werden, die sich hinsichtlich Dicke und Zahl der Neutrophilen entsprechen. Man kann an einem Ausstrich 3 Zonen unterscheiden, die sich unterschiedlich verhalten.



1 = Anfangsteil, der Plasma und vereinzelt Neutrophile, aber keine Erythrocyten enthält.

2 = Mittelteil, in dem die Ausstriche am gleichmäßigsten sind. Hierbei kann man wiederum zwei Abschnitte unterscheiden, die Zone 2a, in der die Ausstriche etwas dicker sind als in der darauffolgenden Zone 2b. Nach der Zone 2b richtet sich, wenn nicht anders vermerkt, die Beurteilung des Halo-Effekts.

3 = Endteil, der sehr dünn ausläuft und häufig eine starke Halo-Bildung zeigt.

Bei sehr kurzen Ausstrichen sind die Zonen so schmal, daß sie nicht mehr getrennt beurteilt werden können. Diese Ausstriche wurden deshalb ausgeschieden. Die Randgebiete des Ausstrichs wurden nicht zur Beurteilung herangezogen.

Zur Beurteilung des Differentialblutbildes wurde von jedem Spender ein Ausstrich nach Pappenheim gefärbt:

1. Ausstrich mit May-Grünwaldlösung bedecken und die Farblösung 3 min einwirken lassen.
2. 4 ml aqua demin auftropfen, 1 min einwirken lassen, mit aqua demin abspülen.
3. 15 min mit Giemsa-Gebrauchslösung färben (10 Tropfen auf 5 ml aqua demin für einen Ausstrich).
4. Mit aqua demin abspülen und den Ausstrich schrägstehend an der Luft trocknen lassen.

BEFUNDE

Nach kurzzeitiger chemischer Fixierung (5 min) der Blutausstriche mit Formol-Sublimat und anschließender Inkubation in NaCl-Boratpuffer für 3 Stunden bei 37° C lassen sich nach Durchführung der Eisenbindungsreaktion um die neutrophilen Granulocyten kreisförmige Zonen (Höfe) erkennen, die frei von Plasma und Erythrocyten sind (Abb. 1). Die Neutrophilen erscheinen stark geschrumpft und sind als solche kaum noch zu erkennen. Gelegentlich lösen sich die verbliebenen Reste der Neutrophilen vollständig vom Objektträger, so daß nur noch leere Höfe erkennbar sind. Das Ausmaß der Hofbildung ist abhängig sowohl von der Dauer der Fixierung als auch der Inkubationsdauer in NaCl-Boratpuffer: Mit zunehmender Fixierungsdauer nimmt die Größe der Höfe ab (Tab. 1). Bei gegebener kurzzeitiger Fixierungsdauer (5 min) nimmt die Hofgröße mit Zunahme der Inkubationsdauer zu (Tab. 2). Ohne Zusatz von NaCl zum Inkubationsmedium unterbleibt eine Hofbildung fast vollständig (Abb. 2). Außer um neutrophile Granulocyten ist eine Hofbildung auch um Monocyten und möglicherweise auch um basophile Granulocyten, nicht dagegen um Lymphocyten und eosinophile Granulocyten nachweisbar.

Die in der vorliegenden Untersuchung hinsichtlich ihres Einflusses auf die Hofbildung getesteten Arzneistoffe lassen sich in drei Gruppen zusammenfassen:
1. Wirkstoffe, die eine Hemmung der Hofbildung verursachen (Beispiel: Glycosaminoglycanpolysulfat und Aurothiopolypeptid, Abb. 3 und 4).
2. Wirkstoffe, die die Hofbildung verstärken ("Aktivierung", Beispiel: Indometacin, vgl. Abb. 1 und 5).
3. Wirkstoffe, die ohne Einfluß auf die Hofbildung bleiben.

Um den hemmenden Einfluß von Arzneistoffen auf die Hofbildung präzise erfassen zu können, wurden die Inkubationszeiten so gewählt, daß an den Kontrollausstrichen, also den mit wirkstoff-freier Pufferlösung behandelten Ausstrichen, eine ausgedehnte Hofbildung zustandekam. Umgekehrt läßt sich eine wirkstoffbedingte Verstärkung der Hofbildung besonders gut dann erkennen, wenn so kurzzeitig inkubiert wird, daß an den Kontrollausstrichen noch keine oder nur eine gering ausgeprägte Hofbildung erkennbar ist. - Die Ergebnisse sind in den Tabellen 3 - 5 zusammengefaßt. Die Beurteilung der Hofgröße erfolgte in willkürlichen Einheiten von Null - keine Hofbildung bis drei - ausgeprägte Hofbildung.

Tab.1: Abhängigkeit der Hofgröße von der Fixierungsdauer
Inkubationsdauer 180 min.

Fixierungsdauer*	Hofgröße**
5	3
10	2
15	1
30	0

Tab.2: Abhängigkeit der Hofgröße von der Inkubationsdauer
in NaCl-Boratpuffer

Inkubationsdauer*	Hofgröße**
30	0
60	0-1
90	1-2
120	2
180	3

* in Minuten

** ausgedrückt in willkürlichen Einheiten von 0-3

Tab.3 Arzneistoffe, die eine Hemmung der Hofbildung bewirken
Inkubationszeit 180 min.

Wirkstoff	Konzentration (mg/ml)						
	5.0	2.0	1.0	0.5	0.25	0.1	Kontrolle**
Glycosaminoglycan-polysulfat Arteparon	*	*	0	0-1	1-2	2	3
Pentosanpolysulfat SP 54	*	*	0	0-1	1	2	3
Aurothiopolypeptid Auro-Detoxin	*	*	0	0-1	1-2	3	3
Prednisolon Solu-Decortin	0	0-1	1	2-3	3	3	3
D-Penicillamin Metalcaptase	0(-1)	1-2	2	2-3	3	3	3
Oxyphenbutazon Tanderil	0	2-3	3	3	3	3	3
Phenylbutazon Butazolidin	0	2-3	3	3	3	3	3

Abhängigkeit der Hofbildung von der Wirkstoffkonzentration

* nicht getestet ** ohne Wirkstoffzusatz

Tab.4 Arzneistoffe, die eine Verstärkung ("Aktivierung") der Hofbildung bewirken
Inkubationszeit 30 min.

Wirkstoff	Konzentration (mg/ml)				
	1.0	0.5	0.25	0.1	Kontrolle*
Indometacin Amuno	3	3	3-2	1-2	0-1
Azathioprin Imurek	3-2	3-2	2	2-1	0-1
Methotrexat Methotrexat "Lederle"	3	3	2-3	2	0-1

Abhängigkeit der Hofbildung von der Wirkstoffkonzentration

*ohne Wirkstoffzusatz

Tab.5 Arzneistoffe ohne Wirkung auf die Hofbildung

Wirkstoff	Konzentration/ Inkubationszeit 1.0 mg/ml 180 min	Kontrolle*	Konzentration/ Inkubationszeit 1.0 mg/ml 30 min	Kontrolle*
Chloroquin Resochin	3	3	0	0
Acetylsalicyl-säure Aspirin	3	3	0	0
Piroxicam Felden	3	3	0	0
Cyclophosphamid Endoxan	3	3	0	0

*ohne Wirkstoffzusatz

DISKUSSION

Die Bedeutung neutrophiler Granulocyten im Ablauf einer Entzündungsreaktion beschrieb Metschnikoff vor mehr als achtzig Jahren: "Sobald Krankheitserreger in den Organismus eingedrungen sind, begiebt sich eine große Zahl von weißen Blutkörperchen an die bedrohte Stelle. In erster Linie sind es die Mikrophagen, welche infolge der Lappung ihres Kerns schnell durch die kleinen Lücken in den Gefäßwänden hindurchzuschlüpfen vermögen. (...) Wie die Amöben ihre Beute vermittels der Amöbendiastase auflösen, so verdauen die weißen Blutkörperchen die aufgenommenen Substanzen durch die "Cytase"." (METSCHNIKOFF 1902).

Was Metschnikoff als Mikrocytase bezeichnet, sind die in den Granula Neutrophiler enthaltenen Enzyme. Eine besondere Rolle beim Abbau sowohl phagozytierten Materials als auch extrazellulärer Gewebsstrukturen spielen neutrale Proteasen in neutrophilen Granulocyten. Aus biochemischen Untersuchungen geht hervor, daß neutrophile Granulocyten wenigstens drei verschiedene biochemisch gut charakterisierte neutrale Proteasen enthalten: Elastase (JANOFF und SCHERER 1968), Kollagenase (LAZARUS et al. 1972) und Kathepsin G (STARKEY und BARRETT 1976). Auf ihre zentrale Bedeutung bei mit Gewebsdestruktion einhergehenden Entzündungsprozessen, besonders solchen des rheumatischen Formenkreises, ist vielfach hingewiesen worden (LAZARUS et al. 1968; LAZARUS et al. 1972; KEISER et al. 1976; JANOFF et al. 1976; BARRETT 1978; ORONSKY und BUERMANN 1978; MOHR et al. 1979; MENNINGER et al. 1980).

Während unter physiologischen Bedingungen nur sehr wenige Zellen in der Gelenkflüssigkeit vorhanden sind, ist die reichliche Ansammlung neutrophiler Granulocyten im entzündlichen Gelenkexsudat ein typisches Kennzeichen akut entzündlicher Gelenkprozesse. Daneben sind im Synovialexsudat auch Lymphocyten und große mononukleäre Zellen nachweisbar, bei denen es sich größtenteils um Synovialdeckzellen handeln dürfte (KELLNER et al. 1975; HUTH und KLEIN 1977).

In cytochemischen Untersuchungen an Ausstrichpräparaten, die von Gelenkpunktaten von Patienten mit akuten Arthritiden unterschiedlicher Genese angefertigt wurden, konnte die Proteasenaktivität sowohl neutrophiler polymorphkerniger Granulocyten als auch großer mononukleärer Zellen nach-

gewiesen werden (JOHANNES und KLESSEN 1981). Da der pH-Wert des entzündlichen Synovialexsudats im allgemeinen zwischen 6.8 und 7.1 liegt (DÜRRIGL 1976), kommen für die Knorpeldestruktion wahrscheinlich nur jene Enzyme in Frage, welche oberhalb dieses pH-Wertes wirksam sind, d.h. neutrale Proteasen, deren pH-Optimum zwischen 7.0 und 8.0 liegt.

Die Gelenkdestruktion im Verlauf entzündlicher Gelenkprozesse wird durch verschiedene Faktoren bestimmt: Zum einen werden sowohl bei der Phagozytose als auch beim Zerfall der im Synovialexsudat vorhandenen neutrophilen Granulocyten und Synovialzellen knorpelabbauende Proteasen freigesetzt; zum anderen dringt das entzündlich veränderte Synovialpannusgewebe in Knorpel, Knochen und Sehnen ein und zerstört diese Gewebe, wobei auch hier den aus neutrophilen Granulocyten und mononukleären Zellen freigesetzten Proteasen eine wesentliche Bedeutung zugemessen wird (Abb. 6; MOHR 1980; MOHR et al. 1980). Schließlich ist damit zu rechnen, daß am Abbau der Knorpelmatrix auch lysosomale Chondrocyten-Proteasen beteiligt sind, welche in unmittelbarer Nachbarschaft der Knorpelzellen Kollagen, Proteoglykane, Glykoproteine und andere Komponenten der Grundsubstanz aufzulösen vermögen. Es wird angenommen, daß diese vom Knorpelgewebe selbst ausgehende Knorpeldestruktion vor allem bei degenerativen Gelenkprozessen eine Rolle spielt (COTTA 1974). Auch durch in vitro Versuche wurde die Fähigkeit neutraler Leukocyten-Proteasen, Proteoglykane der Knorpelmatrix abzubauen, nachgewiesen: Durch Injektion von HLNP (=Human Leukocyte Neutral Protease) in Kniegelenke von Ratten konnten Gelenkveränderungen erzeugt werden, die einer Arthritis entsprachen (ORONSKY und BUERMANN 1978). Hieraus wurde der für therapeutische Überlegungen wichtige Schluß gezogen, daß durch Inhibition neutraler Proteasen die im Ablauf der rheumatischen Arthritis auftretenden Gelenkveränderungen zu beeinflussen sein müßten. Des weiteren konnte experimentell nachgewiesen werden, daß neutrale Proteasen nicht nur Proteoglykane der Knorpelmatrix abbauen, sondern auch Kollagenfasern des Knorpels angreifen: Wird Gelenkknorpel mit Elastase oder Kathepsin G inkubiert, so gehen Knorpelbruchstücke in Lösung (BARRETT 1978).

Vor einer überschießenden Wirkung neutraler Proteasen schützt das Zusammenspiel der Enzyme mit ihren Inhibitoren. Derartige sowohl im Serum zirkulierende als auch in den Geweben und in der Synovialflüssigkeit (BRACKERTZ 1978; FEHR et al. 1979) vorhandene Inhibitoren sind: α_2-Makroglobulin, α_1-Antitrypsin und α_2-Antichymotrypsin. Nicht jeder

dieser Inhibitoren hemmt gleichermaßen alle Proteasen, doch sind die Faktoren, die zur Bildung bestimmter Inhibitor-Enzym-Komplexe führen, nicht genau bekannt. Neben dieser ersten Verteidigungslinie durch hochmolekulare Proteaseinhibitoren existiert eine zweite in Form niedermolekularer gewebsständiger Inhibitoren (TEGNER 1978; FEINSTEIN 1978). Unter pathologischen Bedingungen kann in den Gelenken die Inaktivierung der Proteasen durch Komplexbildung mit den Proteaseinhibitoren unwirksam oder gehemmt sein, wodurch der Gelenkknorpel dem Zugriff der abbauenden Enzyme ausgesetzt ist und die Gelenkdestruktion in Gang gesetzt wird. Von JANOFF (1978) wurde ein Arbeitsmodell für den Abbau von Knorpel durch neutrale Proteasen entwickelt. Der Prozess beginnt mit dem Erscheinen von Bakterien, Viren, Antigen-Antikörper-Komplexen oder Kristallen im Gelenkspalt, wo sie frei oder an die Gelenkoberfläche adsorbiert vorliegen. Durch Aktivierung des Komplementsystems und/oder Freisetzung chemotaktisch wirksamer Substanzen, z.B. aus Bakterien, wandern polymorphkernige Neutrophile in großer Zahl in den Gelenkspalt. Mit Hilfe ihrer lysosomalen Enzyme beginnen sie, eingedrungene Partikel abzubauen. Abbau von gesundem Gewebe wird durch die Wirkung von Inhibitoren verhindert. Nach JANOFF gibt es verschiedene Vorgänge, die zu Insuffizienz der Inhibitoren führen: Freisetzung sehr großer Mengen an Proteasen, die zur Sättigung der Inhibitoren führt; direkte Anlagerung Neutrophiler an die Gelenkoberfläche, wo ein Inhibitor nicht wirksam werden kann, auch wenn er im Gelenkspalt in genügender Menge vorhanden ist.

Wenn neutrale Proteasen aus neutrophilen Granulocyten tatsächlich eine wesentliche Rolle bei der Gelenkdestruktion im Verlauf entzündlicher Gelenkprozesse zukommt, so ist damit zu rechnen, daß zumindest manche therapeutisch effiziente Antirheumatika diese Enzyme zu inhibieren vermögen (KRUZE et al. 1976). Hinsichtlich der Wirksamkeit antirheumatischer Arzneistoffe gibt es bislang kein einheitliches Erklärungskonzept. Dies ist auch nicht zu erwarten, da die eingesetzten Arzneistoffe ganz unterschiedliche Wirkungen entfalten: So ist in bezug auf die klinische Wirksamkeit beispielsweise zu unterscheiden zwischen 1. reinen Analgetika, 2. Analgetika mit antiphlogistischer Wirkung und 3. reinen Antiphlogistika, wobei unterschieden werden kann zwischen schnell wirkenden (Steroide) und langsam wirkenden (Gold, D-Penicillamin u.a.) Substanzen (COSH 1974). Schließlich werden bei malignen Verlaufsformen entzündlicher Gelenkprozesse auch Immunsuppressiva resp. cytotoxisch wirksame Chemotherapeutika eingesetzt, deren entzündungshemmende Wirkung durch

ihre ausgeprägt antiproliferative Eigenschaft (Verminderung der Lymphocytenzahl, Hemmung der Fibroblastenvermehrung) zu erklären ist (HUSMANN 1979). In der vorliegenden Untersuchung wurden typische Vertreter dieser verschiedenen Substanzgruppen eingesetzt.

Aus in vitro-Untersuchungen geht hervor, daß Antirheumatika die Aktivität einer Reihe von Enzymsystemen hemmen oder stimulieren können. Untersucht wurde der Einfluß antirheumatisch wirksamer Arzneistoffe u.a. auf folgende Enzyme: Dehydrogenasen, Carboxylasen, Aminotransferasen, Aminoacyl- und RNS-Synthetase, Nucleinsäuresynthetase und auf Enzyme der oxidativen Phosphorylierung (Lit. SMITH und DAWKINS 1970; DOMENJOZ 1971).

Im Zusammenhang der vorliegenden an Blutausstrichen durchgeführten Untersuchung interessiert, inwieweit Antirheumatika die am Knorpelabbau beteiligten Proteasen aus neutrophilen Granulocyten zu beeinflussen vermögen. In biochemisch orientierten Untersuchungen mit Proteasen aus Milzgewebe (Kathepsin B_1) und aus neutrophilen Granulocyten wurde verschiedentlich der Einfluß von Antirheumatika auf diese Enzyme untersucht (ORONSKY, IGNARRO und PERPER 1973; LEISS und KALBHEN 1976; KRUZE et al. 1976a; KRUZE et al. 1976b). Als Enzymsubstrate wurden hierbei künstliche Peptide, Kollagen und nativer Knorpel verwendet, wobei die durch Antirheumatika bewirkte konzentrationsabhängige Minderung der proteolytischen Aktivität bestimmt wurde.

Als starke, d.h. noch in geringer Konzentration wirksame Proteaseinhibitoren erwiesen sich in diesen Untersuchungen hochsulfatierte polyanionische Wirkstoffe wie Glycosaminoglycanpolysulfat (Arteparon) und Pentosanpolysulfat (SP 54). Diese biochemischen Befunde stehen in guter Übereinstimmung mit den an Blutausstrichen gewonnenen Ergebnissen. So konnte nachgewiesen werden, daß diese Polyanionen eine starke Hemmung der durch neutrale Granulocytenproteasen induzierten Hofbildung bewirken. Ergänzend sei darauf hingewiesen, daß auch andere sulfatierte Polyanionen wie Heparin und Chondroitinsulfat eine Hemmung der Hofbildung bewirken (KLESSEN 1979). Diese Befunde lassen vermuten, daß sulfatierte Polyanionen möglicherweise generell die Aktivität neutraler Proteasen zu hemmen vermögen. Ein weiterer Befund, der in diese Richtung deutet, ergab sich aus Versuchen mit der in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Blutausstrichtechnik, wobei der Einfluß der oxidierten, jeweils als Sulfon-

säure vorliegenden A- und B-Kette des Insulins auf die Hofbildung untersucht wurde (KLESSEN 1981, unveröffentlicht). Auch hierbei ließ sich eine starke Hemmung der Hofbildung nachweisen. Die Hemmung war bei gleicher Konzentration ausgeprägter bei Verwendung der A-Kette als bei Einsatz der B-Kette. Die Ursache für diese Differenz könnte im höheren Sulfonsäuregehalt der A-Kette im Vergleich zur B-Kette liegen.

Als ebenfalls starke Proteaseinhibitoren erwiesen sich in den biochemischen Untersuchungen verschiedene organische Goldverbindungen (ORONSKY et al. 1973; KRUZE et al. 1976 a,b). Auch diese Ergebnisse decken sich mit den cytochemischen Befunden an Blutausstrichen: Aurothiopolypeptid (Auro-Detoxin) bewirkte eine starke Hemmung der Hofbildung um neutrophile Granulocyten. Obwohl Gold seit mehr als 5 Jahrzehnten zur Basistherapie bei der chronischen Polyarthritis gehört, bestehen auch gegenwärtig noch keine klaren und gesicherten Vorstellungen über den Wirkungsmechanismus der Goldbehandlung. Eine der möglichen Wirkungen könnte auf der, jedenfalls bei in vitro Untersuchungen,nachgewiesenen Hemmung der Aktivität lysosomaler Hydrolasen beruhen. Die Hemmung proteolytischer Enzyme spielt dabei möglicherweise eine besondere Rolle. Vorteilhaft für eine derartige Wirkung organischer Goldverbindungen ist die Tatsache, daß die Goldkonzentration im entzündlich veränderten Gewebe größer ist als im gesunden. Eine hohe Goldkonzentration konnte auch in der entzündlich veränderten Synovialis arthritischer Gelenke nachgewiesen werden. Sie lag hier wesentlich höher als in den Gelenken, die noch frei von entzündlichen Veränderungen waren (LAWRENCE 1961).

Ursache der durch Goldverbindungen induzierten Enzymhemmung soll eine Membranstabilisierung sein, wodurch die Freisetzung von Entzündungssubstanzen und lysosomalen Enzymen verhindert wird (PERSELLIN und ZIFF 1966; ENNIS et al. 1968). Daß die durch Gold bewirkte Enzymhemmung nicht allein durch Membranstabilisation, sondern auch durch direkte Enzyminhibierung zustandekommt, geht aus Untersuchungen mit gereinigten Proteasen hervor (KRUZE et al. 1976 a,b). Andererseits konnten LEISS und KALBHEN (1976) bei in vitro Untersuchungen mit Rinderknorpel als Substrat keine durch Gold bewirkte Hemmung leukocytärer Proteasen erzielen, auch bei Verwendung sehr hoher Goldkonzentrationen. Sie werten diesen Befund als Hinweis dafür, daß bei den degenerativen (autolytischen) Gelenkerkrankungen, als deren Modell die von ihnen durchgeführten Untersuchungen zu

betrachten sind, andere biologische Reaktionen als bei entzündlichen Gelenkerkrankungen ablaufen. Diese Wertung wird gestützt durch die klinische Erfahrung, daß entzündungshemmende Antirheumatika bei rein degenerativen Arthrosen praktisch wirkungslos sind (LEISS und KALBHEN 1976). Ebenso ist eine Goldtherapie bei degenerativen Gelenkerkrankungen nicht indiziert (WAGNER und WIRTH 1978). Die Ergebnisse von LEISS und KALBHEN (1976) stehen allerdings im Gegensatz zu Befunden von ORONSKY, IGNARRO und PERPER (1973), die bei Verwendung eines sehr ähnlichen Versuchsansatzes (Knorpel als Substrat für nicht weiter gereinigte leukocytäre Proteasen) durchaus eine Hemmung dieser Enzyme durch Gold nachweisen konnten.

Zu den bei entzündlich-rheumatischen Gelenkerkrankungen, insbesondere der rheumatoiden Arthritis eingesetzten Basistherapeutika gehört auch D-Penicillamin (Metalcaptase). Während die klinische Wirksamkeit gesichert ist, ist der exakte Wirkungsmechanismus dieses Arzneistoffes unbekannt. Die Substanz zeigte in der vorliegenden Untersuchung an Blutausstrichen nur bei Applikation hoher Dosen eine leichte Hemmung der Hofbildung um neutrophile Granulocyten. Bei der Testung der Wirkung von D-Penicillamin auf die Aktivität gereinigter neutraler Leukocyten-Proteasen konnte ebenfalls nur eine leichte Aktivitätshemmung bei hohen Penicillaminkonzentrationen nachgewiesen werden (KRUZE et al. 1976 b).

Bei Verwendung eines Extraktes aus durch Dextran-Applikation entzündlich veränderten Rattenpfoten, welcher sowohl Proteasen als auch deren Substrate (Proteine) enthält, konnte nach Zusatz von Penicillamin keine Hemmung des Proteinabbaues nachgewiesen werden. Eine dosisabhängige Hemmung ließ sich dagegen durch Antiphlogistika wie Phenylbutazon und Indometacin feststellen (MÖRSDORF et al. 1972). Im Gegensatz dazu ließ sich durch Penicillamin bei Verwendung des gleichen Rattenpfotenextraktes eine Hemmung der Hydrolyse eines synthetischen Substrates erzielen (MÖRSDORF et al. 1972). Eine therapeutisch effiziente Proteasenhemmung bewirkt Penicillamin bei Hornhautgeschwüren, die von einer stark entzündlichen Reaktion begleitet sind (FRANCOIS, CAMBIE und FEHER 1973). Faßt man diese und weitere in der Literatur mitgeteilten Befunde über die durch Penicillamin bewirkte Hemmung von Proteasen zusammen, so ergibt sich kein einheitliches Bild. Dabei ist zu bedenken, daß die teilweise kontroversen Befunde mit sehr unterschiedlichen Versuchsanordnungen gewonnen wurden.

Bei der Behandlung entzündlicher Gelenkprozesse, insbesondere der rheumatischen Arthritis werden häufig Korticosteroide eingesetzt. Von KRUZE et al. (1976) ist untersucht worden, inwieweit Steroide (u.a. Cortison, Cortisol, Prednison, Prednisolon, Dexamethason) die Aktivität neutraler Granulocytenproteasen hemmen. Dabei zeigte sich, daß lediglich mit Prednisolon eine Aktivitätshemmung zu erzielen war. In der vorliegenden Untersuchung ergab sich für Prednisolon (Solu-Decortin) - andere Steroide wurden nicht getestet - ebenfalls eine Hemmung der Hofbildung um neutrophile Granulocyten. Die cytochemisch an Blutausstrichen gewonnenen Befunde stehen somit in Übereinstimmung mit den Ergebnissen biochemischer Untersuchungen. Worauf die Aktivitätshemmung neutraler Granulocytenproteasen durch Prednisolon im einzelnen beruht, bleibt unklar. Allgemein wird Steroiden eine lysosomenstabilisierende Wirkung zugeschrieben.

Eine Hemmung der Hofbildung konnte auch mit den Pyrazolonderivaten Oxyphenbutazon (Tanderil) und Phenylbutazon (Butazolidin) erzielt werden. Hierzu wurden allerdings vergleichsweise hohe Wirkstoffkonzentrationen benötigt. Der hemmende Einfluß von Pyrazolonderivaten auf die Aktivität verschiedener proteolytischer Enzyme ist in biochemisch-pharmakologisch orientierten Studien vielfach nachgewiesen worden, womit die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung eine Bestätigung finden. Beide Arzneistoffe erwiesen sich in biochemischen Untersuchungen gegenüber isolierten Proteasen aus neutrophilen Granulocyten als Enzyminhibitoren (KRUZE et al. 1976). Bei in vitro Versuchen konnte mit Phenylbutazon der durch leukocytäre Proteasen induzierte Knorpelabbau gehemmt werden (LEISS und KALBHEN 1976). In Untersuchungen an Homogenaten von entzündlich verändertem Rattenpfotengewebe wurde eine Hemmung der Proteasen-Aktivität nachgewiesen, wenn die Ratten mit Phenylbutazon vorbehandelt waren (HLADOVEC und RYBACK 1963; MÖRSDORF et al. 1966; MÜLLER-VELBEN 1968). Auch gegenüber gereinigten Proteasen wie Trypsin, Chymotrypsin, Kallikrein, Pronase und Kollagenase erwiesen sich Pyrazolonderivate als wirksame Enzyminhibitoren (DOMENJOZ 1971, Lit.).

Keinen Einfluß auf die Hofbildung um neutrophile Granulocyten hatten folgende Arzneistoffe: Acetylsalicylsäure (Aspirin), Chloroquindiphosphat (Resochin) und Piroxicam (Felden). Diese Befunde stehen - jedenfalls was Acetylsalicylsäure und Chloroquin betrifft, von Piroxicam sind uns Untersuchungen bezüglich des Einflusses dieser Substanz auf die Aktivität von leukocytären Proteasen bislang nicht bekannt geworden -

ebenfalls in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen biochemischer Untersuchungen. Während KRUZE et al. (1976b) für Acetylsalicylsäure und Natriumsalicylat nur in sehr hoher Konzentration (10^{-2}M) eine geringfügige Hemmung (10% resp. 15%) nachweisen konnten, ließ sich in den Untersuchungen von LEISS und KALBHEN (1976) auch bei sehr hoher Natriumsalicylatkonzentration keine Hemmung des durch leukocytäre Proteasen bedingten Knorpelabbaus feststellen. Auch mit Chloroquindiphosphat, welches ebenfalls in der vorliegenden Untersuchung eingesetzt wurde, konnten LEISS und KALBHEN keine Enzymhemmung nachweisen. Dies entspricht den Ergebnissen von IGNARRO und COLOMBO (1972), die mit Chloroquin keine Aktivitätshemmung leukocytärer Proteasen feststellen konnten. Eine leichte Hemmung neutraler Proteasen durch andere Chloroquinderivate (Chloroquinsulfat und Hydroxychloroquinsulfat) ließ sich dagegen in den Untersuchungen von KRUZE et al. (1976b) nachweisen. Hinsichtlich des Wirkungsmechanismus dieser Arzneistoffe (Acetylsalicylsäure und Chloroquin) existieren eine Fülle von Einzelergebnissen, die jedoch in kein Gesamtkonzept zu fassen sind. Entscheidend im Zusammenhang mit der vorliegenden Untersuchung ist jedoch, daß die antientzündliche Wirkung dieser Pharmaka offenbar in anderen Mechanismen zu suchen ist als in der Hemmung leukocytärer Proteasen (HUSMANN 1979). Die vorliegenden, an Blutausstrichen gewonnenen Ergebnisse bestätigen diese Vorstellung.

Ebenfalls keine Hemmung der Hofbildung ließ sich mit den cytotoxisch resp. immunsuppressiven Wirkstoffen Cyclophosphamid (Endoxan) und Azathioprin (Imurek) erzielen. Für die Beurteilung der Wirkung von Cyclophosphamid muß berücksichtigt werden, daß dieser Wirkstoff erst nach Oxidation durch mikrosomale Enzyme der Leber cytotoxisch wirksam wird. In den biochemisch orientierten Untersuchungen von KRUZE et al. (1976b) konnte ebenfalls keine Hemmung der Aktivität neutraler Leukocytenproteasen durch Cyclophosphamid und Azathioprin nachgewiesen werden.

Allerdings ist mit einer "indirekten" Wirkung von Cyclophosphamid auf proteolytische Leukocytenenzyme insofern zu rechnen als ausreichend hohe Dosen dieser Substanz eine Leukopenie in Blut und Geweben bewirken, wodurch auch weniger Leukocytenproteasen für die Propagierung entzündlicher Gelenkprozesse zur Verfügung stehen dürften. Dies mag ein Wirkungsmechanismus neben verschiedenen anderen sein, auf dem die therapeutische Effizienz von Cyclophosphamid bei manchen Formen entzündlicher Gelenkerkrankungen beruht.

Eine im Vergleich zu den Kontrollausstrichen verstärkte Hofbildung bewirkten das Antirheumatikum Indometacin (Amuno) sowie die immunsuppressiv bzw. cytostatisch wirksamen Substanzen Azathioprin und Methotrexat. Bezüglich Indometacin stehen die vorliegenden Befunde im Gegensatz zu den Ergebnissen von KRUZE et al. (1976b), die eine durch Indometacin bewirkte Hemmung der Aktivität neutraler Neutrophilen-Proteasen nachweisen konnten. Auch in anderen biochemisch-pharmakologisch orientierten Untersuchungen an nicht näher definierten Proteasen (Extrakte aus entzündlich verändertem Rattenpfotengewebe) wurde eine Hemmung der Enzymaktivität durch Indometacin nachgewiesen (MÖRSDORF et al. 1972). - Für die Wirkung von Azathioprin und Methotrexat auf die Aktivität leukocytärer Proteasen liegen aus anderen Untersuchungen nur wenige Befunde vor, die mit den in der vorliegenden Untersuchung erzielten Ergebnissen verglichen werden könnten. Im Gegensatz zu der durch Azathioprin bewirkten verstärkten Hofbildung um neutrophile Granulocyten konnten KRUZE et al. (1976) in ihren Untersuchungen an gereinigten Granulocyten-Proteasen keinen durch Azathioprin bewirkten Effekt auf die Enzymaktivität feststellen. Hinsichtlich der Wirkung von Methotrexat speziell auf die Aktivität neutraler Proteasen aus neutrophilen Granulocyten sind uns bislang keine Untersuchungsergebnisse bekannt geworden. Dagegen wurde von MÖRSDORF et al. (1972) im Rahmen von Untersuchungen zur antiphlogistischen Aktivität verschiedener Cytostatika die Wirkung des Methotrexats auf in entzündlich verändertem Rattenpfotengewebe vorhandenen Proteasen getestet. Dabei zeigte sich, daß durch Zusatz von Methotrexat zum Inkubationsmedium die Spaltung eines künstlichen Substrates (Acetyltyrosinethylester) verstärkt wurde. Methotrexat erhöhte in diesem speziellen Testsystem also die proteolytische Aktivität. Dieser Befund zeigt eine gewisse Übereinstimmung mit der durch Methotrexat erzielten Verstärkung der Hofbildung um neutrophile Granulocyten in der vorliegenden Untersuchung.

Worauf die durch verschiedene Arzneistoffe bedingte Förderung der Hofbildung um neutrophile Granulocyten beruht, bleibt unklar. Handelt es sich hierbei um eine echte Aktivierung der entsprechenden Proteasen oder werden nur die Membranen der Neutrophilen durchlässiger, so daß die Proteasen rascher und vielleicht auch in größeren Mengen aus den Zellen austreten können? Erfolgt durch die "aktivierenden" Pharmaka eventuell eine Destabilisierung des Substrates, das dadurch leichter von den Neutrophilen-Proteasen abgebaut werden kann? Die vorliegende Studie kann

entsprechend ihrem methodischen Ansatz diese Frage nicht beantworten.

Faßt man die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zusammen und setzt sie in Zusammenhang mit den Resultaten entsprechender biochemischer Untersuchungen, so läßt sich folgendes feststellen:

1. Hinsichtlich der Hemmung neutraler Proteasen durch antirheumatisch wirksame Pharmaka besteht zwischen den cytochemischen Befunden an Blutausstrichpräparaten einerseits und den mittels biochemischer Technik ermittelten Befunden andererseits eine weitgehende Übereinstimmung.

2. Diese Ubereinstimmung betrifft insbesondere die nachweisbare Enzymhemmung durch polyanionische Wirkstoffe (Glycosaminoglycanpolysulfat und Pentosanpolysulfat) und Gold. Auch mit dem Glucocorticoid Prednisolon sowie den Pyrazolonderivaten Oxyphenbutazon und Phenylbutazon ließ sich eine Hemmung erzielen. Die typische Form der Abhängigkeit der Hemmung von der eingesetzten Arzneistoffkonzentration zeigt Ubereinstimmung mit den biochemischen Ergebnissen: Während die polyanionischen Pharmaka sowie Gold bereits in sehr niedriger Konzentration eine Hemmung der Hofbildung bewirkten, waren von Prednisolon und Penicillamin sowie den Pyrazolonderivaten erheblich höhere Konzentrationen erforderlich.

3. Ubereinstimmung besteht auch bezüglich einer fehlenden Enzymhemmung durch Acetylsalicylsäure, Chloroquin, Piroxicam und Cyclophosphamid.

4. Eine Ubereinstimmung zwischen cytochemischen und biochemischen Resultaten fehlt für Indometacin, Methotrexat und Azathioprin. Diese Arzneistoffe förderten die Hofbildung.

Der in der vorliegenden Untersuchung verwendete Test zur Prüfung des Einflusses antirheumatisch wirksamer Arzneistoffe auf die Aktivität neutraler Proteasen in neutrophilen Granulocyten zeigt - von wenigen Ausnahmen abgesehen - eine hohe Ubereinstimmung mit den Ergebnissen biochemischer Untersuchungen. Er ist einfach in seiner Anwendung, läßt sich in kurzer Zeit durchführen und verursacht kaum Kosten. Es bleibt abzuwarten, inwieweit sich dieser einfache Objektträgertest dazu eignet, die Anti-Proteasen-Wirkung antirheumatisch wirksamer Arzneistoffe im Sinne eines Screening-Tests zu überprüfen.

ZUSAMMENFASSUNG

Neutrophile Granulocyten enthalten verschiedene im neutralen bis leicht alkalischen pH-Bereich wirksame Proteasen, denen eine besondere Bedeutung bei der Gelenk- und Knochendestruktion im Rahmen chronischer Gelenkentzündungen beigemessen wird. Derartige neutrale Granulocyten-Proteasen lassen sich mit einer einfachen cytochemischen Technik an Blutausstrichen nachweisen. Die enzymatische Aktivität der aus neutrophilen Granulocyten freigesetzten Proteasen dokumentiert sich bei Verwendung dieser Technik in einem ringförmigen Abbau von Erythrocyten und Plasma um die jeweils zentral gelegenen Neutrophilen.

Aufgabe der vorliegenden Studie war es, zu untersuchen, inwieweit antirheumatisch wirksame Arzneistoffe die durch Proteasen bewirkte Hofbildung um neutrophile Granulocyten zu hemmen vermögen. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung geht hervor, daß hinsichtlich der Hemmung neutraler Proteasen durch antirheumatisch wirksame Pharmaka zwischen den cytochemischen Befunden an Blutausstrichpräparaten einerseits und den mittels biochemischer Technik ermittelten Befunden andererseits weitgehende Übereinstimmung besteht. Diese Übereinstimmung betrifft insbesondere die nachweisbare Enzymhemmung resp. Hemmung der Hofbildung um neutrophile Granulocyten durch polyanionische Wirkstoffe (Glycosaminoglycanpolysulfat und Pentosanpolysulfat), Aurothiopolypeptid, Prednisolon, Penicillamin, Phenylbutazon und Oxyphenbutazon. Übereinstimmung besteht auch bezüglich einer fehlenden Enzymhemmung durch Acetylsalicylsäure, Chloroquin, Piroxicam und Cyclophosphamid. Eine Übereinstimmung zwischen cytochemischen und biochemischen Resultaten fehlt für Indometacin, Methotrexat und Azathioprin. Diese Arzneistoffe förderten die Hofbildung.

Der in der vorliegenden Untersuchung verwendete Test zur Prüfung des Einflusses antirheumatisch wirksamer Arzneistoffe auf die Aktivität neutraler Proteasen in neutrophilen Granulocyten zeigt somit - von wenigen Ausnahmen abgesehen - eine hohe Übereinstimmung mit den Resultaten biochemischer Untersuchungen. Er ist damit möglicherweise geeignet, die Anti-Protease-Wirkung von Arzneistoffen im Sinne eines Screening-Tests zu überprüfen.

LITERATUR

Barrett A J (1978) Capacity of leukocyte elastase and cathepsin G to degrade native collagen fibers. In: Havemann K, Janoff A (eds) Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes. Urban und Schwarzenberg, Baltimore Munich, pp 385-389

Barrett A J (1978) The possible role of neutrophilic proteases in damage to articular cartilage. Agents Actions 8:11-18

Brackertz D (1978) Proteinaseninhibition bei rheumatischen Erkrankungen. Dtsch med Wschr 103:1844-1849

Cosh J A (1974) Anti-inflammatory drugs in rheumatic diseases. Practitioner 213:519-526

Cotta H (1974) Präarthrose und präarthrotische Deformität. Z Orthop 112:8-24

Craddock P R, Fehr J, Brigham K L, Kronenberg R S, Jacob H S (1977) Complement and leukocyte-mediated pneumonary disfunction in hemodialysis. N Engl J Med 296:769-774

Domenjoz R (1971) The pharmacology of antirheumatic agents. In: Fehr K, Müller W, Harwerth H W (eds) Rheumatoid arthritis. Academic Press, London New York, pp 513-550

Dürrigl T (1976) Die Untersuchung von Gelenkpunktaten. Fortschr Rheumatol 4:149-160

Ennis R S, Granda J L, Possner A S (1968) Effect of gold salt and other drugs on the release and activity of lysosomal hydrolases. Arthr Rheuma 11:756-759

François J, Cambie E, Feher J (1973) Collagenase inhibition with penicillamine. Opthalmologica (Basel) 166:222-225

Fehr K, Baici A, Velvart M, Knöpfel M, Rauber G, Sommermeyer P, Salgam P, Böni A (1979) Die chronische Polyarthritis. Rolle der Polymorphkernigen Leukocyten bei der Zerstörung von Pannus-freiem Gelenkknorpel. Bull Schweiz Akad Med Wiss 35:317-327

Feinstein G (1978) Studies of inhibitor complexes of granulocyte neutral proteases with endogenous serum inhibitors and actinomycetes polypeptides. In: Havemann K, Janoff A (eds) Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes. Urban und Schwarzenberg, Baltimore Munich, pp 179-190

Grundmann E (1975) Blut, Knochenmark und lymphatisches Gewebe. In: Grundmann E (ed) Lehrbuch der speziellen Pathologie. Urban und Schwarzenberg, München Wien Baltimore, pp 73-131

Harris E D, Faulkner C S, Brown F E (1975) Collagenolytic systems in rheumatoid arthritis. Clin Orthop Rel Res 110:303-316

Hladovec J, Ryback M (1963) A specific esterase in experimental inflammation. Biochem Pharmacol 12:1058-1061

Husmann F (1979) Die Wirkungsmechanismen der Antirheumatika. Akt Rheumatol 4:Teil 1, pp 5-17, Teil 2, pp 45-57, Teil 3, pp 103-122

Huth F, Klein W (1977) Punktionsdiagnostik von Gelenken. Ferdinand Enke, Stuttgart p 17

Ignarro L J, Colombo C (1972) Enzyme release from guinea-pig polymorphonuclear leukocyte lysosomes inhibited in vitro by anti-inflammatory drugs. Nature (New Biol) 239:155-157

Johannes M L, Klessen Ch (1981) Cytochemical detection of proteases in synovial fluid of arthritic joints. Histochemistry 73:49-56

Janoff A, Scherer J (1968) Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX. Elastinolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes. J exp Med 128:1137-1155

Janoff A (1970) Mediators of tissue damage in leukocyte lysosomes. Lab Invest 22:228-336

Janoff A (1975) At least three human neutrophil lysosomal proteases are capable of degrading joint connective tissue. Ann NY Acad Sci 256:402-408

Janoff A, Feinstein G, Malemud C J, Elias J D (1976) Degradation of cartilage proteoglycan by human leucocyte granule neutral protease. A model of joint injury. I. Penetration of enzyme into rabbit articular cartilage and release of $^{35}SO_4$-labeled material from the tissue. J Clin Invest 57:615-624

Janoff A (1978) Granulocyte elastase role in arthritis and in pulmonary emphysema. In: Havemann K, Janoff A (eds) Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes. Urban und Schwarzenberg, Baltimore Munich, pp 390-417

Keiser H, Greenwald R A, Feinstein G, Janoff A (1976) Degradation of cartilage proteoglykan by human leucocyte granule neutral proteases. A model of joint injury. II. Degradation of isolated bovine nasal cartilage proteoglykan. J Clin Invest 57:625-632

Kellner G, Klein G, Eberl R (1975) Zytologie und Histochemie von Synoviazellen verschiedener Arthritisformen. Z Rheumatol 34:1-2

Klessen Ch (1978) On testing the activity of proteases from human polymorphonuclear neutrophils on blood smears. J Histochem Cytochem 26:759-760

Klessen Ch (1979) Cytochemische Untersuchungen zum Nachweis von Proteasen in neutrophilen Granulocyten. Verh Anat Ges 73:851-852

Klessen Ch, Tekolf W (1980) Cytochemical investigation of neutral proteases in polymorphonuclear (PMN) neutrophils in acute inflammatory diseases. Histochemistry 69:307-314

Kruze D, Fehr K, Menninger H, Böni A (1976) Effect of antirheumatic drugs on neutral proteases from human leukocyte granules. Z Rheumatol 35:337-346

Laurell C B, Eriksson S (1963) The electrophoretic α_1-globulin pattern of serum in α_1-antitrypsin deficiency. Scand J Clin Lab Invest 15:132-140

Lawrence J S (1961) Studies with radioactive gold. Ann Rheum Dis 20:341-345

Lazarus G S, Daniels J R, Brown R S, Bladen H A, Fullmer H M (1968) Degradation of collagen by human granulocyte collagenolytic system. J Clin Invest 47:2622-2624

Lazarus G S, Daniels J R, Kari J, Burleigh M C (1972) Role of granulocyte collagenase in collagen degradation. Am J Path 68:565-578

Lee T C, Feei A M, Lippmann M, Holtzman H, Kimbel Ph, Weinbaum G (1981) Elastolytic activity in pulmonary lavage fluid from patients with adult respiratory-distress syndrome. N Engl J Med 304:192-196

Leiss O, Kalbhen D A (1976) Untersuchungen über den durch leukozytäre Enzyme stimulierten Abbau von Knorpelgewebe und seine Beeinflussung durch antirheumatische Arzneimittel. Arzneim Forsch (Drug Res) 26:165-169

Lennart K (1977) Blut und Knochenmark. In: Eder M, Gedigk P (eds) Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 343-417

Lillie R D, Fullmer H M (1976) Histopathologic technic and practical histochemistry. 4th ed. McGraw Hill, New York, p 883

Menninger H, Putzier R, Mohr W, Wessinghage D, Tillmann K (1980) Granulocyte elastase at the site of cartilage erosion by rheumatoid synovial tissue. Z Rheumatol 39:145-156

Metschnikoff E (1902) Immunität bei Infektionskrankheiten. Gustav Fischer Jena

Mohr W, Menninger H, Putzier R (1979) Morphologische Hinweise für die Beteiligung neutrophiler Granulocyten an der rheumatischen Knorpeldestruktion. Bull Schweiz Akad Med Wiss 35:443-451

Mohr W, Endres-Klein R, Bell B (1980) Neutrophile Granulocyten bei der rheumatischen Gewebsdestruktion. Med Welt 45:1618-1624

Mohr W (1980) Pathogenese der entzündlichen Knorpelzerstörung bei der chronischen Polyarthritis. Dtsch med Wschr 105:868-872

Mörsdorf K, Marten S, Puchert I (1968) Ein Beitrag zur antiproteolytischen Wirkungsqualität von Phenylbutazon, Oxyphenbutazon und Natrium-Salicylat. Arzneim Forsch (Drug Res) 18: 1516-1518

Mörsdorf K, Knippertz T, Rausch K D, Domenjoz R (1972) Studies on the antiphlogistic activity of cytostatics. Pharmacol 7:209-215

Müller G (1955) Über eine Vereinfachung der Reaktion nach Hale. Acta Histochem Jena 2:68-70

Müller-Velten U (1969) Das Verhalten esterolytisch bzw. proteolytisch wirksamer Fermentsysteme im Pfotengewebe, in der Leber, in der Niere und im Serum der Ratte bei der Kaolin-Arthritis ohne und mit Einfluß von Phenylbutazon. Dissertation Bonn

Murray J F (1977) Mechanisms of acute respiratory failure. Am Rev Resp Dis 115:1071-1078

Oronsky A L, Ignarro L J, Perper R J (1973) Release of cartilage muco-polysaccharide-degrading neutral protease from human leucocytes. J Exp Med 138:461-472

Oronsky A L, Buermann Ch W (1978) Granulocyte neutral proteases in Arthritis. In: Havemann K, Janoff A(eds) Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes. Urban und Schwarzenberg, Baltimore Munich pp 361-371

Persellin R H, Ziff M (1966) The effect of gold salt on lysosomal enzymes of the peritoneal macrophage. Arthr Rheum 9:57-65

Rodriguez R J, White R R, Senior R M et al. (1977) Elastase release from human alveolar macrophages: comparison between smokers and non-smokers. Science 198:313-314

Schuster F, Eberl R, Altmann H (1970) Über Goldbestimmungen in synovialem Gewebe und Nebenwirkungen der Goldtherapie. Z Rheumaforsch 29:193-198

Skidmore I F, Whitehouse M W (1966) Biochemical properties of anti-inflammatory drugs. Part VIII Inhibition of histamine formation catalysed by substrate specific mammalian histamine decarboxylases. Drug antagonism of aldehyde binding of protein amino groups. Biochem Pharmacol 15:1965-1983

Smith M J H, Dawkins P D, McArthur J N (1971) The relation between clinical anti-inflammatory activity and the displacement of L-tryptophan and a dipeptide from human serum in vitro. J Pharm Pharmacol 23:451

Starkey P M, Barrett A J (1976a) Neutral proteases of human spleen. Purification and criteria for homogeneity of elastase and cathepsin G. Biochem J 155:255-263

Starkey P M, Barrett A J (1976b) Human cathepsin G. Catalytic and immunological properties. Biochem J 155:273-278

Tegner H, Ohlsson K (1978) Localization of a low-molecular-weight protease inhibitor to tracheal and maxillary sinus mucosa. In: Havemann K, Janoff A (eds) Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes. Urban und Schwarzenberg, Baltimore Munich pp 208-214

Teir H, Wirkström S (1970) Milz und Granulozytenhaushalt. In Lennert K, Harms D (eds) Die Milz Springer, Berlin Heidelberg New York pp 317-329

Wagner H, Wirth W (1978) Zur Goldbehandlung der rheumatischen Arthritis. Z Rheumatol 37: 4-11

Abbildungslegenden

Abb. 1 - 5 Blutausstriche. Färbung: Eisenbindungsreaktion

Abb. 1 Inkubation in 0.25 M NaCl-Boratpuffer pH 8.5, 180 min. Hofbildung um neutrophile Granulocyten

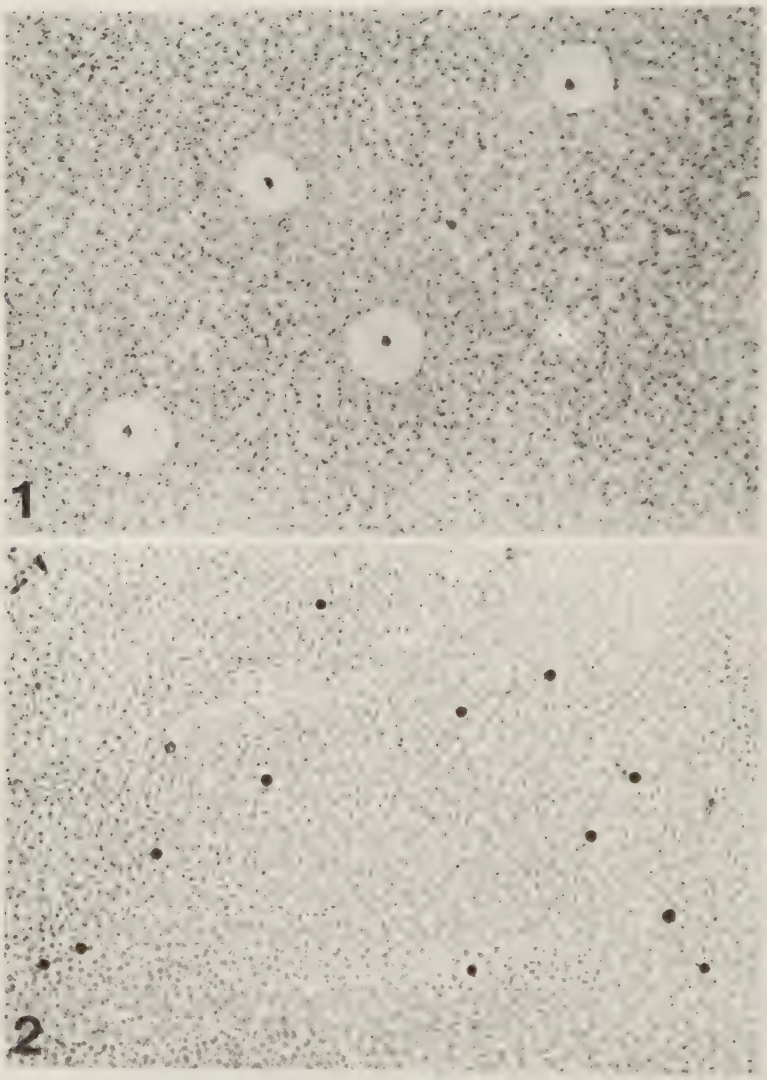
Abb. 2 Inkubation in Boratpuffer (ohne NaCl) pH 8.5, 180 min. Keine Hofbildung

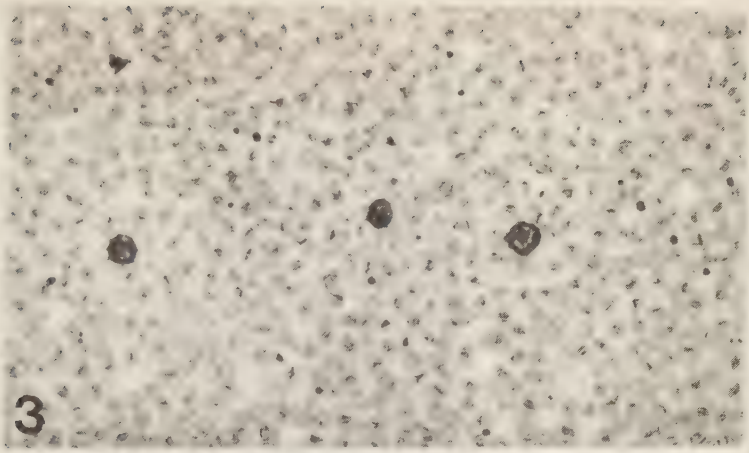
Abb. 3 Inkubation in 0.25 M NaCl-Boratpuffer pH 8.5, 180 min. unter Zusatz von Glycosaminoglykanpolysulfat (100 mg%). Vollständige Hemmung der Hofbildung

Abb. 4 Inkubation in 0.25 M NaCl-Boratpuffer pH 8.5, 180 min. unter Zusatz von Aurothiopolypeptid (10 mg%). Deutliche Hemmung der Hofbildung

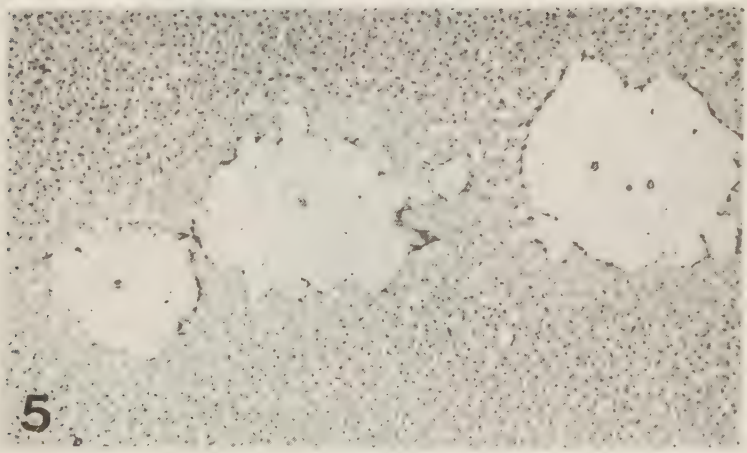
Abb. 5 Inkubation in 0.25 M NaCl-Boratpuffer pH 8.5, 30 min. unter Zusatz von Indometacin (50 mg%). Die Hofbildung ist verstärkt (vergl. Tab. 4)

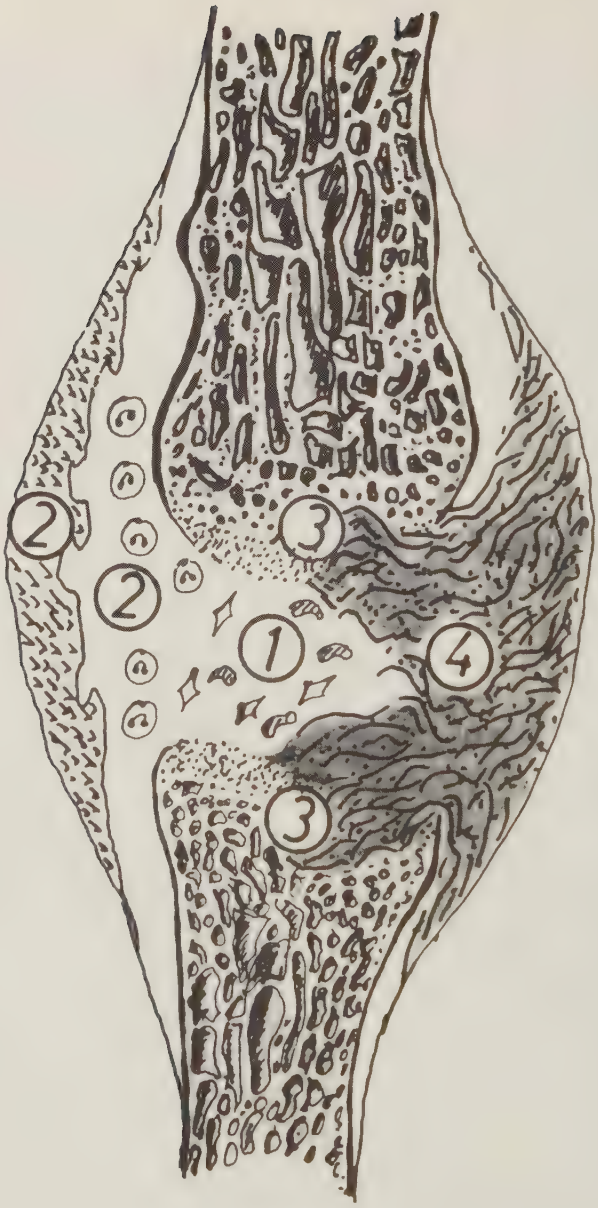
Abb. 6 Faktoren, die zur Gelenkdestruktion führen. 1. Eindringen von Noxen (Bakterien, Ag/Ak-Komplexen, Fremdkörpern) in den Gelenkspalt; 2. Entzündliche Reaktion des Stratum synoviale mit Proliferation der Synovialdeckzellen, Gelenkerguß, Emigration neutrophiler Granulozyten; 3. Knorpeldestruktion durch proteolytische Enzyme, Fibrinniederschläge; 4. Organisation der Fibrinniederschläge des Stratum synoviale durch einsprossende Gefäße, Wachstum des Pannus in den Gelenkspalt, Gelenkknorpel und Knochen, Endstadium: Ankylose


1
2


3

4


5


2
2
3
1
4
3

LEBENSLAUF

Am 1.9.1957 wurde ich, Gabriele Katharina Löffler, als Tochter des Heinrich Löffler und der Anne Löffler in Tübingen geboren. Nach dem Besuch der Grundschule in Horb und des mathematisch-naturwissenschaftlichen Gymnasiums in Horb und Tuttlingen legte ich im Mai 1976 die Reifeprüfung ab.
Im Wintersemester 1976/77 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen. Den vorklinischen Studienabschnitt beschloß ich im August 1978 mit dem Physikum. Das Staatsexamen beendete ich am 26.4.1983. Die mündliche Prüfung legte ich am Städtischen Krankenhaus in Friedrichshafen ab, wo ich während des Praktischen Jahres war.
Die vorgelegte Dissertation begann ich im Frühjahr 1979 am Anatomischen Institut.